



University of Groningen

## On the enzymatic cycle of p-hydroxybenzoate hydroxylase

Laan, Jan Metske van der

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

### *Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

### *Publication date:*

1986

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

### *Citation for published version (APA):*

Laan, J. M. V. D. (1986). On the enzymatic cycle of p-hydroxybenzoate hydroxylase. s.n.

### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

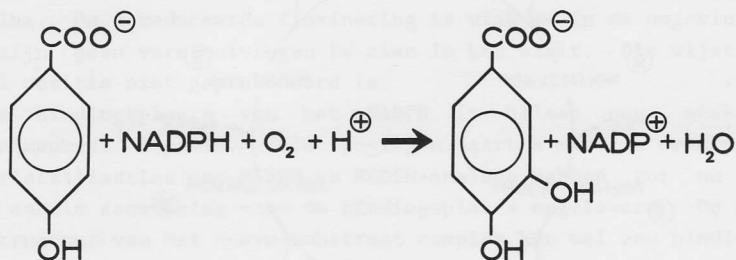
### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

### Samenvatting.

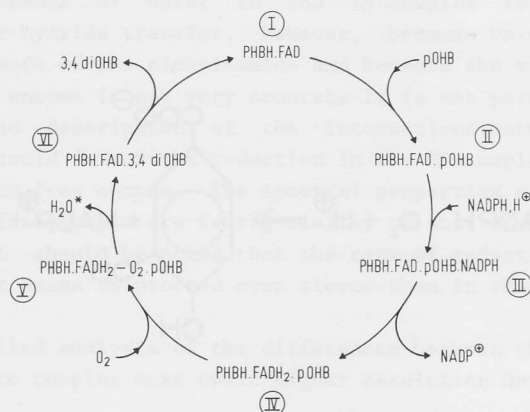
Het enzym para-hydroxy benzoaat hydroxylase (PHBH) uit de bacterie *Pseudomonas fluorescence* katalyseert de volgende reactie:



Het enzym bestaat uit een keten opgebouwd uit 392 aminozuren met als prosthetische groep flavine adenine dinucleotide (FAD), dat niet covalent, doch wel op zeer specifieke wijze aan het eiwit gebonden is. De eigenschappen van de flavine worden in belangrijke mate door de interacties met het eiwit bepaald. In PHBH activeert de flavine een zuurstof molecule waarvan één atoom op één zeer specifieke plaats wordt ingebouwd in het substraat, terwijl het andere atoom een watermolecuul vormt. Hiervoor zijn vier electronen nodig: twee worden geleverd door het coenzym NADPH, de andere twee door het substraat. De beschreven reactie is een eerste stap in de afbraak van de zeer stabiele aromatische ring.

De hydroxylering van p-hydroxybenzoaat verloopt via een aantal afzonderlijke stappen. De reductie van de flavine vindt plaats nadat het enzym-substraat complex gevormd is. De reactie van zuurstof ( $O_2$ ) met de gereduceerde flavine is pas mogelijk als  $NADP^+$  niet meer aan het gereduceerde enzym-substraat complex gebonden is. De volledige "kringloop" van het enzym is weergegeven in figuur 1.

PHBH katalyseert in feite twee reacties: (1) reductie van FAD door NADPH, (2) de hydroxylatie van het substraat. Om het mechanisme van deze reacties, de wisselwerking tussen flavine en eiwit en de substraat specificiteit goed te kunnen bestuderen is het noodzakelijk de driedimensionale structuur van het eiwit te kennen. Die kan worden bepaald d.m.v. röntgendiffractie. De structuur van PHBH met substraat (II) werd reeds bepaald tot een oplossend vermogen van 2.5 Å door R.K.Wierenga (J.Mol.Biol. (1979) 139,55-73).



Figuur 1.

De voortgang van het PHBH onderzoek werd daarna echter ernstig belemmerd doordat het enzym niet meer goed wilde kristalliseren en zonder goede kristallen is röntgendiffractie onmogelijk. Het bleek dat het PHBH-preparaat niet homogeen was: op een ionenwisselaar werden fracties met een verschillende lading geïsoleerd en met HPLC gelfiltratie werden verschillende aggregatietoestanden waargenomen. Er zijn sterke aanwijzingen dat de oxydatie van Cys-116, die een positie heeft aan het oppervlak van het enzym, de oorzaak is van deze heterogeniteit. Goede kristallen worden alleen verkregen door die fracties te gebruiken welke hoofdzakelijk dimeren bevatten met een intacte SH-groep aan Cys-116. Het toevoegen van de reductiemiddelen zoals dithioniet, dithiotreitol en sulfiet zijn gunstig voor de kristallisatie waarbij vooral sulfiet een wondermiddel bleek te zijn.

Om de aanhechtingsplaats van het coenzym te vinden werden verschillende complexen bereid o.a. van het enzym met ADPR (adenine diphosphoribose). Het bleek dat de kristallen van het PHBH-substraat complex, welke anaeroob groeiden in de aanwezigheid van dithioniet en ADPR, kleurloos waren. De natieve kristallen met een geoxydeerde flavine zijn helder geel. We konden aantonen dat de kleurloze kristallen geen flavine meer bevatten. Er zijn sterke aanwijzingen dat een

Een andere manier reductie van de flavine werden kristallen van afwezigheid van zuur. Laten we echter daarna in de kristallen het p

We hebben de structuur en vonden dat deze complex. De gereduceerde N1 zijn geen verschuiving de N1 positie niet gep

De bindingsplaats experimenteel bepaald co-kristallisaties met geen enkele aanwijzing de structuur van het enzym worden voorspeld. In de bindingsplaats afgeschermd afscherming en de belemmeren waarschijnlijk

Een kristallisatie het substraat-vrije kwaliteit werd een berekend. Grote onderlinge orientatie het actieve centrum en 214, Arg-220, Tyr-214 waarschijnlijk water. van het eiwit iets verzwakt lijken tot kristalstructuur van Door een grotere bew het substraat echter Misschien is deze kristallisatie resulteert fixeert als het ware interacties met zowel centrum. De flavine orientatie van de flavine de polaire interactie versterkt en een negatieve beter gestabiliseerd naar het actieve centrum substraat vrije waterstofbruggen. De

Een andere manier om kleurloze kristallen te verkrijgen is door reductie van de flavine met NADPH in afwezigheid van zuurstof. Hiervoor werden kristallen van het enzym-substraat complex gebruikt. In afwezigheid van zuurstof stopt de reactie na reductie van de flavine. Laten we echter daarna zuurstof toe dan zijn er sterke aanwijzingen dat in de kristallen het product 3,4 dihydroxybenzoezuur wordt gevormd.

We hebben de structuur van het gereduceerde enzym substraat bepaald en vonden dat deze vrijwel identiek is aan die van het geoxydeerde complex. De gereduceerde flavinering is vlak en in de omgeving van de N1 zijn geen verschuivingen te zien in het eiwit. Dit wijst erop dat de N1 positie niet geprotoneerd is.

De bindingsplaats van het NADPH is helaas nog steeds niet experimenteel bepaald. Vele pogingen daartoe middels drenkproeven en co-kristallisaties met NADPH en NADPH-analoga hebben tot nu toe nog geen enkele aanwijzing voor de bindingsplaats opgeleverd. Op grond van de structuur van het enzym-substraat complex kan wel een bindingsplaats worden voorspeld. In het kristal wordt een deel van de voorspelde bindingsplaats afgeschermd door buurmoleculen in het kristal. Deze afscherming en de hoge ionstrekke van het kristallisatie medium belemmeren waarschijnlijk de binding van NADPH in de kristallen.

Een kristallisatie die nog steeds erg moeizaam verloopt is die van het substraat-vrije enzym (I). Met drie kristallen van matige kwaliteit werd een data set tot 3.0 Å verzameld en de structuur berekend. Grote conformatie veranderingen met betrekking tot de onderlinge orientatie van de domains werden niet gevonden. Wel zijn in het actieve centrum enkele residuen duidelijk verschoven, zoals Arg-214, Arg-220, Tyr-222 en Tyr-201. Op de plaats van het substraat zit waarschijnlijk water. Verder is de positie van de flavine ten opzichte van het eiwit iets veranderd waardoor de contacten met het eiwit wat verzwakt lijken te zijn. Het actieve centrum is ook in de kristalstructuur van het substraatvrije enzym niet erg toegankelijk. Door een grotere beweeglijkheid van de PHBH domains t.o.v. elkaar zou het substraat echter toch vrij gemakkelijk kunnen worden gebonden. Misschien is deze beweeglijkheid ook de reden voor de slechte kristallisatie resultaten met het substraat vrije enzym. Het substraat fixeert als het ware de domains rondom het actieve centrum door interacties met zowel hydrofobe als polaire aminozuren in het actieve centrum. De flavine ring krijgt hierdoor minder bewegingsvrijheid en de orientatie van de flavine ring t.o.v. het eiwit verandert zodanig dat de polaire interacties van flavine-N(1), -O2 en O4 met het eiwit worden versterkt en een negatieve lading op N(1) in het gereduceerde eiwit beter gestabiliseerd wordt door het elektrisch veld van de helix die naar het actieve centrum wijst. De flavine-N(5) vormt zowel in het substraat vrije als in het substraat-enzym complex geen waterstofbruggen. De reactiviteit van de flavine C4a positie wordt dus

in PHBH niet gereguleerd door een waterstofbrug met de flavine N(5) zoals voorgesteld is door Massey en Hemmerich (Biochem. Soc. Trans 8, p.246).

Ook in het gereduceerde enzym substraat complex (IV) vormt de flavine-N(5) geen waterstofbrug met het eiwit. Zowel in het gereduceerde als in het geoxydeerde enzym substraat complex is de flavine ring vlak. Moonen heeft er in zijn proefschrift (Wageningen, 1983) op gewezen dat een vlakke flavine ring waarin N(10) en N(5) volledig  $sp^2$  gehybridiseerd zijn een hoge affiniteit heeft voor zuurstof. In het substraat vrije enzym is vooral rond de N(5) positie de electronendichtheid slecht te interpreteren, zodat niet is vast te stellen of de N(5) buiten het flavine vlak is komen te liggen zoals is geconcludeerd uit NMR metingen door Moonen (proefschrift, Wageningen 1983).

De reactie met zuurstof en de daarop volgende hydroxylering van het substraat verlopen zo snel dat het moeilijk is om de structuur van de intermediären te bepalen. Onze resultaten wijzen erop dat de hydroxylering ook in het kristal kan plaats vinden. Visser heeft op grond van de structuur van het geoxydeerde enzym substraat complex een mechanisme voorgesteld waarin de hydroxylering verloopt via een flavine (C4-C4a)-dioxetaan intermediair (Eur. J. Biochem (1983) 135, p. 543).

Aangezien de structuur van het gereduceerde enzym substraat complex gelijk is aan dat van het geoxydeerde, wint dit mechanisme aan kracht. Alternatieve mechanismen vereisen tot dusver steeds een aantal conformatie veranderingen in het actieve centrum. In overeenstemming met de structuur spelen zijketen groepen geen rol in dit reactiemechanisme. Meer experimentele gegevens zijn nodig om de preciese mechanismes, zowel met betrekking tot de reductie reactie als ook m.b.t. de hydroxylatie reactie op te helderen. Wellicht kunnen ook theoretische berekeningen belangrijke aanwijzingen geven.

De structurele onderzoeken hebben tot nu toe reeds veel informatie opgeleverd, waardoor het inzicht in de structuur-functie relatie van PHBH aanzienlijk verdiept is.

## Nomenclature

### DATA SETS

ES	: na
E	: fr
ES.ADPR.dithio	: PH
	di
ES.ADPRP	: ES
ES.NADPH.N <sub>2</sub>	: ES
	ni

### Systematic names

E.FAD	: na
E. FADH <sub>2</sub>	: PH
E. FAD.S	: PH
E.FADH <sub>2</sub> .S	: re
E.AMP.S	: th
	pr